

9P/1636
File No.: ST96016-US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of: Pierre Wils et al.

Group Art Unit: 1636

#13

Serial No.:

09/153,838

Examiner: J. Ketter

Filed:

September 15, 1998

RECEIVED

For:

PURIFICATION OF PLASMID DNA OF
PHARMACEUTICAL QUALITY

FEB 08 2001

TECH CENTER 1600/2900


CERTIFICATE OF MAILING (37 CFR 1.8a)

I hereby certify that this paper (along with any referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the: Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231.

Bonnie Stein

Date: 1-30-01

(Type or print name of person mailing paper)


(Signature of person mailing paper)

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, DC 20231

**SUBMISSION AND REQUEST FOR ENTRY
OF PRIORITY PAPERS 37 C.F.R. § 1.55(a)**


Dear Sir:

Applicants submit herewith certified copys of French application(s), _____
96/03519, (all) filed on 21 March 1996, for which priority is
claimed in the above-identified application.

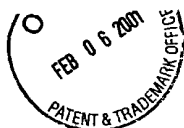
This submission and request for entry is being made to satisfy the requirements under 35 U.S.C. § 119. Please note that no fees are associated with the entry of the priority documents since they are being timely submitted prior to the date the issue fee is due.

Respectfully submitted,

Dated: 1/30/01


Irving Newman
Attorney for Applicant(s)
Registration No. 22,638

Aventis Pharmaceuticals, Inc.
Rt. 202-206
Mailstop EMC-G1
Bridgewater, N.J. 08807
Telephone: (908) 231-2795
Telefax: (908) 231-2626



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 NOV. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLÂCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>

REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

1

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRÉ
DU RAPPORT DE RECHERCHE *

☐ OUI

☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ OUI

☒ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

AVENTIS PHARMA SA
Direction Brevets
20, avenue Raymond Aron
92165 ANTONY CEDEX

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

ST 96016

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

(1) 40 91 69 22

DATE DE REMISE DES PIÈCES

21.MAR1996

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 03519 -

DATE DE DÉPÔT

21 MARS 1996

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

1er janvier 1994

7 TITRE DE L'INVENTION

PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE DE QUALITÉ PHARMACEUTIQUE

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN.

3104416132184

RHONE-POULENC RORER S.A.

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

20, avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANCAISE

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR *

☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT* OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES*

☐ OUI

☒ NON

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ DE REVENDEMENT DE PRIORITÉ

☒ DE REVENDEMENT (à partir de la 11e)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES A LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

RHONE-POULENC RORER S.A.

Fondé de Pouvoir

Françoise LOBJOIS

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ A LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9603519

ST 96016

TITRE DE L'INVENTION :

PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE DE QUALITÉ PHARMACEUTIQUE

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

RHONE-POULENC RORER S.A.
20, avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :


OLLIVIER Monique
9, Place Victor Hugo
94270 LE KREMLIN BICETRE
FRANCE

WILS Pierre
36, rue de Montmorency
75003 PARIS
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire
Antony, le 21 mars 1996

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir


Françoise LOBBOIS

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
38,40			X	26.02.97	

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE DE QUALITE PHARMACEUTIQUE

La présente invention concerne un nouveau procédé pour la purification d'ADN. Le procédé selon l'invention permet de purifier rapidement de l'ADN double brin utilisable pharmacologiquement. Plus particulièrement, le procédé de purification
5 selon l'invention ne fait intervenir que de la diafiltration et des chromatographies.

Les techniques de thérapie génique et cellulaire connaissent actuellement un développement extraordinaire. Néanmoins, ces techniques impliquent la possibilité de produire des quantités importantes d'ADN de pureté pharmacologique, en particulier d'ADN plasmidique. En effet dans ces nouvelles thérapies, le médicament est souvent
10 constitué par l'ADN lui-même, et il est essentiel de pouvoir le fabriquer dans des quantités adaptées, l'isoler et le purifier de manière appropriée à un usage thérapeutique chez l'homme, notamment par voie intraveineuse.

Ces problèmes de quantités et de pureté n'ont pas été pris en compte dans les méthodes classiques d'isolement de l'ADN. De ce fait les méthodes utilisées en
15 laboratoire ne sont pas transposables dans le domaine de l'industrie pharmaceutique pour purifier de l'ADN plasmidique. Deux de ces méthodes sont les plus utilisées et sont celles qui donnent les meilleurs résultats. Elles consistent à partir d'un lysat bactérien brut et à l'enrichir en ADN plasmidique en éliminant un maximum de contaminants. En particulier le lysozyme du blanc d'oeuf est utilisé pour casser la paroi
20 bactérienne puis le lysat est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite soumis à l'action d'une Rnase pancréatique d'origine animale qui permet d'éliminer l'ARN, qui représente à ce moment environ 75% des acides nucléiques présents.

Les protéines sont alors précipitées par un mélange phénol/
25 chloroforme/isoamyl-alcool. Le surnageant obtenu après centrifugation est débarrassé des protéines et de l'ARN mais contient encore de grandes quantités d'ADN chromosomique qui doit être éliminé lors d'une étape supplémentaire. Cette étape consiste en une ultracentrifugation en présence de Bromure d'Ethidium et de Chlorure de Césium. Les trois types d'acides nucléiques que sont l'ADN chromosomique, l'ADN

plasmidique et l'ARN ont une plus ou moins grande capacité à fixer le bromure d'éthidium. De ce fait ils se séparent en trois phases distinctes lors d'une ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium.

5 Une variante de ce protocole consiste à faire suivre l'action de la Rnase pancréatique par une réduction en présence d'un détergent alcalin, suivie par une extraction au phénol/ chloroforme. L'ADN est alors précipité par de l'éthanol, remis en suspension et reprécipité au polyéthylène glycol.

10 Ces deux méthodes qui permettent d'obtenir une solution d'ADN plasmidique sont cependant inutilisables pour la production industrielle d'un produit de pureté pharmaceutique. En effet l'utilisation d'enzymes d'origine animale pose problème. Ainsi le lysozyme et la Rnase pancréatique, du fait de leur origine, risquent d'introduire une contamination virale dans le produit final. De plus, les solvants organiques sont extrêmement toxiques et doivent être éliminés si l'on veut pouvoir utiliser le produit comme médicament. Ces solvant induisent également une augmentation considérable
15 des coûts, liée notamment à leur stockage, leur utilisation dans des conditions de sécurité maximales et l'élimination des déchets toxiques qu'ils imposent, et aussi en raison de la difficulté rencontrée pour réussir à valider l'élimination complète de tels produits de la solution finale. Le bromure d'éthidium est quand à lui tellement toxique, mutagène et tératogène que sa présence même sous forme de traces ne peut être
20 tolérée dans un produit à destination pharmaceutique. L'utilisation de solvants, de réactifs toxiques, de même que d'enzymes d'origine animale est incompatible avec un procédé industriel répondant aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

La présente invention décrit un nouveau procédé simple et particulièrement efficace pour la purification d'ADN. Le procédé décrit dans la présente demande
25 permet la production en grande quantité d'un ADN de très grande pureté. D'une manière particulièrement avantageuse le procédé décrit dans la présente demande permet d'éviter l'emploi de solvants organiques toxiques et d'enzymes d'origine animale. Il permet également de s'affranchir de centrifugations nombreuses et fastidieuses difficiles à extrapoler et de faible rendement en raison notamment d'étapes
30 de précipitation au PEG, à l'acétate d'ammonium ou au CaCl_2 . Le procédé selon

l'invention permet également d'obtenir de grandes quantités d'ADN (100 mg, 1g, 10 g ou plus) en un seul lot, sans difficulté technique particulière. En outre le procédé selon l'invention fait appel à des méthodes compatibles avec les Bonnes Pratiques de Fabrication et permet d'obtenir un ADN de qualité pharmaceutique.

- 5 Un premier objet de l'invention concerne un procédé pour la purification d'ADN double-brin permettant d'obtenir très rapidement de grandes quantités d'ADN plasmidique de pureté pharmaceutique, faisant intervenir une étape de chromatographie sur colonne hydroxyapatite sous forme céramique. L'hydroxyapatite sous forme cristalline était déjà connue mais, du fait de sa fragilité, d'un emploi difficile et limité. La forme céramique est beaucoup plus résistante autant sur un plan physique
10 que sur un plan chimique.

D'une manière préférée, le procédé de l'invention comprend deux étapes de chromatographie, l'une au moins étant une chromatographie sur hydroxyapatite.

- Avantageusement, la deuxième chromatographie est une chromatographie
15 d'affinité ou d'échange d'ions. Les deux chromatographies peuvent être faites dans un ordre indifférent.

- Selon un mode de réalisation particulièrement préférée, le procédé selon l'invention comprend une étape de chromatographie sur colonne hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'affinité Triple-Hélice. La chromatographie d'affinité
20 Triple-Hélice est basée sur l'utilisation d'un support sur lequel est couplé de manière covalente un oligonucléotide capable de former par hybridation une triple hélice avec une séquence spécifique présente sur ledit ADN. Les deux chromatographies peuvent être faites dans un ordre indifférent.

- Selon un autre mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend une
25 étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'échange d'anions.

Avantageusement, le procédé de l'invention comprend en outre une étape de diafiltration. Celle-ci est généralement réalisée avant les chromatographies.

Une étape importante du procédé de l'invention fait intervenir une chromatographie sur colonne hydroxyapatite.

L'hydroxyapatite est un phosphate de calcium complexe comportant dix atomes de calcium. La forme céramic plus stable que la forme cristalline a été mise
5 au point par Bio-Rad Laboratories et Asahi Optical Co., Ltd. Le composé céramique a les mêmes propriétés que le composé cristallin sans en avoir les limitations physiques; ce matériau est surtout utilisé en chromatographie pour la purification des protéines, mais présente des avantages et permet d'obtenir de très bons résultats lors de la purification d'acides nucléiques. Il est macroporeux, sphérique, chimiquement et
10 physiquement très stable et peut être réutilisé plusieurs dizaines de fois sans pertes d'efficacité. Cette forme ceramic peut supporter des pressions élevées, des pH très élevés, des flux très rapides et les solvants organiques.

La chromatographie sur colonne de ceramic hydroxyapatite est un type de chromatographie particulier qui n'est ni une chromatographie d'affinité ni un échange
15 d'ion aux sens stricts. Elle empreinte ses propriétés à ces deux types de chromatographies et l'on pourrait la définir comme a une pseudo-affinité et un pseudo échange d'ions.

Les acides nucléiques se lient à l'hydroxyapatite par la vertu d'interactions entre les groupes phosphate du squelette du polynucléotide et les résidus calcium du support. Les acides nucléiques peuvent être élués de façon différentielle en faisant
20 varier la force ionique des tampons phosphates. Les acides nucléiques peuvent être ainsi séparés des protéines et entre eux, les ADN des ARN et les ADN simple brins des ADN double-brins. Les ARN sont ceux qui se lient de la manière la moins solide et peuvent être élués avec un tampon de force ionique relativement faible. Les ADN
25 simple brins sont également moins fortement fixé que les ADN double-brins qui sont plus solidement liés au support et nécessitent un tampon plus fort.

Le matériel biologique dans un tampon phosphate de faible force ionique est déposé sur la colonne. Les acides nucléiques ADN et ARN sont fixés. Un second tampon, de force ionique plus élevée, est ensuite utilisé pour éluer l'ARN qui est

quasiment complètement éliminé à ce stade. Un troisième tampon de force ionique supérieure est utilisé pour éluer l'ADN double brin qui est recueilli. L'utilisation d'hydroxyapatite dans le procédé de l'invention permet de récupérer de l'ADN double brin ayant un très grand degré de pureté.

- 5 Comme indiqué ci-avant, un mode de réalisation préféré de l'invention comprend en outre une étape de chromatographie d'affinité triple hélice.

La chromatographie d'affinité triple hélice consiste à faire passer la solution obtenue sur un support sur lequel est couplé de manière covalente un oligonucléotide capable de former par hybridation une triple hélice avec une séquence spécifique
10 présente sur l'ADN à purifier (PCT/FR95/01468).

La séquence spécifique peut être une séquence présente naturellement sur l'ADN double-brin, ou une séquence synthétique introduite artificiellement dans celui-ci. Les oligonucléotides utilisés dans la présente invention sont des oligonucléotides hybridant directement avec l'ADN en double-brin. Ces
15 oligonucléotides peuvent contenir les bases suivantes :

- thymidine (T), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double-brin (Rajagopal et al, Biochem 28 (1989) 7859);

- adénine (A), qui est capable de former des triplets avec les doublets A.T de l'ADN double-brin;

20 - guanine (G), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double-brin;

- cytosine protonée (C+), qui est capable de former des triplets avec les doublets G.C de l'ADN double-brin (Rajagopal et al précitée);

- uracile (U) qui est capable de former des triplets avec les paires de bases
25 A.U ou A.T.

Préférentiellement, l'oligonucléotide utilisé comprend une séquence homopyrimidique riche en cytosines et la séquence spécifique présente sur l'ADN est une séquence homopurique-homopyrimidique. La présence de cytosines permet d'avoir une triple hélice stable à pH acide, où les cytosines sont protonées, et
 5 déstabilisée à pH alcalin, où les cytosines sont neutralisées.

Pour permettre la formation d'une triple-hélice par hybridation, il est important que l'oligonucléotide et la séquence spécifique présente sur l'ADN soient complémentaires. A cet égard, pour obtenir les meilleurs rendements et la meilleure sélectivité, on utilise dans le procédé de l'invention un oligonucléotide et une
 10 séquence spécifique parfaitement complémentaires. Il peut s'agir en particulier d'un oligonucléotide poly-CTT et d'une séquence spécifique poly-GAA. A titre d'exemple, on peut citer l'oligonucléotide de séquence 5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (GAGG(CTT)⁷; (SEQ ID n°1), dans lequel les bases GAGG ne forment pas de triple hélice mais permettent d'espacer
 15 l'oligonucléotide du bras de couplage. On peut également citer la séquence (CTT)⁷ (SEQ ID n°2). Ces oligonucleotides sont capables de former une triple-hélice avec une séquence spécifique comportant des motifs complémentaires (GAA). Il peut s'agir en particulier d'une région comportant 7, 14 ou 17 motifs GAA, comme décrit dans les exemples.

20 Une autre séquence d'intérêt spécifique est la séquence :

5'-AAGGGAGGGAGGAGAGGAA-3'(SEQ ID n°3).

Cette séquence forme une triple hélice avec les oligonucléotides

5'-AAGGAGAGGAGGGAGGGAA-3'(SEQ ID n°4) ou

5'-TTGGTGTGGTGGGTGGGT-3'(SEQ ID n°5).

25 Dans ce cas, l'oligonucléotide se fixe dans une orientation antiparallèle au brin polypurique. Ces triples hélices ne sont stables qu'en présence de Mg²⁺ (Vasquez et

al., Biochemistry, 1995, 34, 7243-7251 ; Beal et Dervan, Science, 1991, 251, 1360-1363).

Comme indiqué ci-avant, la séquence spécifique peut être une séquence présente naturellement sur l'ADN double-brin, ou une séquence synthétique introduite artificiellement dans celui-ci. Il est particulièrement intéressant d'utiliser un oligonucleotide capable de former une triple-hélice avec une séquence présente naturellement sur l'ADN double-brin, par exemple dans l'origine de réplication d'un plasmide ou dans un gène marqueur. A cet égard, la demanderesse a effectué des analyses de séquence de plasmides et a pu montrer que certaines régions de ces ADN, notamment dans l'origine de réplication, possèdent des régions homopurique-homopyrimidiques. La synthèse d'oligonucléotides capables de former des triple-hélices avec ces régions homopurique-homopyrimidiques naturelles permet avantageusement d'appliquer le procédé de l'invention a des plasmides non modifiés, notamment des plasmides commerciaux de type pUC, pBR322, pSV, etc. Parmi les séquences homopuriques-homopyrimidiques naturellement présentes sur un ADN double brin, on peut citer une séquence comprenant tout ou partie de la séquence 5'-CTTCCCGAAGGGAGAAAGG-3'(SEQ ID n°6) présente dans l'origine de réplication ColE1 de *E. coli*. Dans ce cas, l'oligonucléotide formant la triple hélice possède la séquence : 5'-GAAGGGTTCTTCCCTCTTCC-3'(SEQ ID n°7) et se fixe alternativement sur les deux brins de la double hélice, comme décrit par Beal et Dervan (J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 4976-4982) et Jayasena et Johnston (Nucleic Acids Res. 1992, 20, 5279-5288). On peut aussi citer la séquence 5'-GAAAAAGGAAGAG-3'(SEQ ID n°8) du gène de la β -lactamase du plasmide pBR322 (Duval-Valentin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 504-508). L'utilisation d'un oligonucléotide capable de former une triple-hélice avec une séquence présente dans une origine de réplication ou un gène marqueur est particulièrement avantageuse car elle permet, avec le même oligonucléotide, de purifier tout ADN contenant ladite origine de réplication ou ledit gène marqueur. Il n'est donc pas nécessaire de modifier le plasmide ou l'ADN double-brin pour lui incorporer une séquence spécifique artificielle.

Bien que des séquences parfaitement complémentaires soient préférées il est entendu toutefois que certains mésappariements peuvent être tolérés entre la séquence de l'oligonucléotide et la séquence présente sur l'ADN, dès lors qu'ils ne conduisent pas à une perte trop grande d'affinité. On peut citer la séquence 5'-
 5 AAAAAAGGGAATAAGGG-3'(SEQ ID n°9) présente dans le gène de la β -lactamase de *E. coli*. Dans ce cas, la thymine interrompant la séquence polypurique peut être reconnue par une guanine du troisième brin, formant ainsi un triplet ATG qui est stable quand il est encadré par deux triplets TAT (Kiessling et al., Biochemistry, 1992, 31, 2829-2834).

10 Selon un mode de réalisation particulier, les oligonucléotides de l'invention comprennent la séquence (CCT) n , la séquence (CT) n ou la séquence (CTT) n , dans laquelle n est un nombre entier compris entre 1 et 15 inclus. Il est particulièrement
 15 avantageux d'utiliser des séquences de type (CT) n ou (CTT) n . La demanderesse a en effet montré que le rendement de purification était influencé par la quantité de C dans l'oligonucléotide. En particulier, comme indiqué dans l'exemple 7, le rendement de
 20 purification augmente lorsque l'oligonucléotide comporte moins de cytosines. Il est entendu que les oligonucléotides de l'invention peuvent également combiner des motifs (CCT), (CT) ou (CTT).

L'oligonucléotide utilisé peut être naturel (composé de bases naturelles, non
 20 modifiées) ou modifié chimiquement. En particulier, l'oligonucléotide peut présenter avantageusement certaines modifications chimiques permettant d'augmenter sa résistance ou sa protection vis à vis des nucléases, ou son affinité vis à vis de la séquence spécifique.

Selon la présente invention on entend aussi par oligonucléotide tout
 25 enchainement de nucléosides ayant subi une modification du squelette dans le but de le rendre plus résistant aux nucléases. Parmi les modifications possibles on peut citer, les oligonucléotides phosphorothioates qui sont capable de former des triples hélices avec l'ADN (Xodo et al., Nucleic Acids Res., 1994, 22, 3322-3330), de même que les oligonucléotides possédant des squelettes formacétal ou méthylphosphonate

(Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, 7767-7768). On peut également utiliser les oligonucléotides synthétisés avec des α -anomères de nucléotides, qui forment également des triples hélices avec l'ADN (Le Doan et al., Nucleic Acids Res., 1987, 15, 7749-7760). Une autre modification du squelette est la liaison

5 phosphoramidate. On peut citer par exemple la liaison internucléotidique N3'-P5' phosphoramidate décrite par Gryaznov et Chen, qui donne des oligonucléotides formant avec l'ADN des triples hélices particulièrement stables (J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 3143-3144). Parmi les autres modifications du squelette, on peut citer également l'utilisation de ribonucléotides, de 2'-O-méthylribose, de

10 phosphodiester,...(Sun et Hélène, Curr. Opinion Struct. Biol., 116, 3143-3144). Le squelette phosphoré peut enfin être remplacé par un squelette polyamide comme dans les PNA (Peptide Nucleic Acid), qui peuvent également former des triples hélices (Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500 ; Kim et al., J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 6477-6481) ou par un squelette à base de guanidine, comme dans les DNG

15 (déoxyribonucleic guanidine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 6097-6101), analogues polycationiques de l'ADN, qui forment également des triples hélices.

La thymine du troisième brin peut aussi être remplacée par une 5-bromouracile, ce qui augmente l'affinité de l'oligonucléotide pour l'ADN (Povsic et Dervan, J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 3059-3061). Le troisième brin peut

20 également contenir des bases non naturelles, parmi lesquelles on peut citer la 7-déaza-2'-déoxyxanthosine (Milligan et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21, 327-333), la 1-(2-déoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-méthyl-5-amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine-7-one (Koh et Dervan, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1470-1478), la 8-oxoadénine, la 2-aminopurine, la 2'-O-méthyl-pseudoisocytidine, ou toute autre modification connue

25 de l'homme du métier (voir pour revue Sun et Hélène, Curr. Opinion Struct. Biol., 1993, 3, 345-356).

Un autre type de modification de l'oligonucléotide a plus particulièrement pour objet d'améliorer l'interaction et/ou l'affinité entre l'oligonucléotide et la séquence spécifique. En particulier, une modification tout à fait avantageuse selon

30 l'invention consiste à méthyler les cytosines de l'oligonucléotide. L'oligonucléotide

ainsi méthylé présente la propriété remarquable de former une triple hélice stable avec la séquence spécifique dans des zones de pH plus proches de la neutralité (≥ 5). Il permet donc de travailler à des pH plus élevés que les oligonucléotides de l'art antérieur, c'est à dire à des pH où les risques de dégradation de l'ADN plasmidique sont bien inférieurs.

La longueur de l'oligonucléotide utilisé dans le procédé de l'invention est d'au moins 3 bases, et de préférence, comprise entre 5 et 30. On utilise de manière avantageuse un oligonucléotide de longueur supérieure à 10 bases. La longueur peut être adaptée au cas par cas par l'homme du métier en fonction de la sélectivité et de la stabilité de l'interaction recherchées.

Les oligonucléotides selon l'invention peuvent être synthétisés par toute technique connue. En particulier, ils peuvent être préparés au moyen de synthétiseurs d'acides nucléiques. Toute autre méthode connue de l'homme du métier peut bien évidemment être utilisée.

Pour permettre son couplage covalent sur le support, l'oligonucléotide est généralement fonctionnalisé. Ainsi, il peut être modifié par un groupement terminal thiol, amine ou carboxyle, en position 5' ou 3'. En particulier, l'ajout d'un groupe thiol, amine ou carboxyle permet, par exemple, de coupler l'oligonucléotide sur un support portant des fonctions disulfure, maléimide, amine, carboxyle, ester, époxyde, bromure de cyanogène ou aldéhyde. Ces couplages se forment par établissement de liaisons disulfure, thioether, ester, amide ou amine entre l'oligonucléotide et le support. Toute autre méthode connue de l'homme du métier peut être utilisée, telle que des réactifs de couplage bifonctionnels, par exemple.

Par ailleurs, pour améliorer l'hybridation avec l'oligonucléotide couplé, il peut être avantageux que l'oligonucléotide contienne un "bras" et une séquence de bases "espaceur". L'utilisation d'un bras permet en effet de fixer l'oligonucléotide à une distance choisie du support permettant d'améliorer ses conditions d'interaction avec l'ADN. Le bras est avantageusement constitué d'une chaîne carbonée linéaire, comprenant 1 à 18, et de préférence 6 ou 12 groupes (CH₂), et d'une amine qui

permet la liaison à la colonne. Le bras est relié à un phosphate de l'oligonucléotide ou d'un "espaceur" composé de bases n'interférant pas avec l'hybridation. Ainsi, "l'espaceur" peut comprendre des bases puriques. A titre d'exemple, "l'espaceur" peut comprendre la séquence GAGG. Le bras est avantageusement composé d'une chaîne carbonée linéaire comprenant 6 ou 12 atomes de carbones.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, différents types de supports peuvent être utilisés. Il peut s'agir de supports de chromatographie fonctionnalisés, en vrac ou préconditionnés en colonne, de surfaces plastiques fonctionnalisées ou de billes de latex fonctionnalisées, magnétiques ou non. Il s'agit préférentiellement de supports de chromatographie. A titre d'exemple, les supports de chromatographie pouvant être utilisés sont l'agarose, l'acrylamide ou le Dextran ainsi que leurs dérivés (tels que Séphadex, Sépharose, Superose,...), les polymères tels que le poly(styrène-divinylbenzène), ou la silice greffée ou non greffée, par exemple. Les colonnes de chromatographie peuvent fonctionner en mode de diffusion ou de perfusion.

Pour obtenir de meilleurs rendements de purification, il est particulièrement avantageux d'utiliser, sur le plasmide, une séquence comportant plusieurs positions d'hybridation avec l'oligonucléotide. La présence de plusieurs positions d'hybridation favorise en effet les interactions entre ladite séquence et l'oligonucléotide, ce qui conduit à améliorer les rendements de purification. Ainsi pour un oligonucléotide comportant n répétitions de motifs (CCT), (CT) ou (CTT), il est préférable d'utiliser une séquence d'ADN comportant au moins n motifs complémentaires et, de préférence, $n+1$ motifs complémentaires. Une séquence portant $n+1$ motifs complémentaires offre ainsi deux positions d'hybridation à l'oligonucléotide. Avantageusement, la séquence d'ADN comporte jusqu'à 11 positions d'hybridation, c'est à dire $n+10$ motifs complémentaires.

Selon un autre mode de réalisation la chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite céramique est suivie ou précédée d'une étape de chromatographie sur colonne d'échange d'anions. On utilise de préférence une colonne échangeuse

d'anions faibles, les anions forts ont en effet la propriété de fixer très fortement l'ADN, si fortement qu'il est très difficile de récupérer le produit (le rendement est alors inférieur à 60%). C'est pourquoi la demanderesse utilise des échangeurs d'anions faibles qui ne retiennent pas l'ADN plasmidique mais qui fixent les ARN résiduels.

- 5 Comme indiqué ci-avant, le procédé selon l'invention comprend avantageusement une étape de diafiltration. La diafiltration est une étape de concentration de l'échantillon au cours de laquelle on élimine l'eau et les petites molécules (telles que les sels, les protéines et les acides nucléiques de petite taille) présentes dans le lysat clair. Les sels sont remplacés par un tampon phosphate pour la
- 10 chromatographie. Après diafiltration, la solution est de 5 à 50 fois plus concentrée que la solution de départ (le facteur de concentration dépend du volume de la solution de départ).

- L'utilisation de la diafiltration présente plusieurs avantages. Elle permet entre autres d'éviter l'utilisation de solvants organiques tel que l'isopropanol dont l'emploi
- 15 nécessiterait une installation anti-déflagrante. De plus, cette technique est utilisable pour des volumes très variables. Il suffit en effet d'augmenter la surface des membranes en fonction du volume à traiter.

- On utilise avantageusement pour la diafiltration un appareil servant de support à une membrane de polyether sulfone modifié ou d'acétate de cellulose modifié
- 20 permettant d'avoir un flux de liquide à débit réglable. Ces membranes sont définies par leur point de coupure qui est en valeur nominale la taille maximale des molécules pouvant traverser ladite membrane. Rapporté à une valeur réelle une membrane dont le point de coupure est égal à 100 kD permet de retenir des molécules de taille supérieure à 30 kD.

- 25 Un procédé préféré selon l'invention comprend les étapes suivantes :
- diafiltration,
 - chromatographie sur colonne de Ceramic hydroxyapatite,
 - et chromatographie d'affinité par hybridation spécifique entre une séquence de l'ADN et un oligonucléotide avec formation d'une triple hélice.

Le procédé selon la présente invention peut être utilisé pour purifier tout type d'ADN double brin. Il s'agit par exemple d'ADN circulaire, tel qu'un plasmide portant généralement un ou plusieurs gènes d'intérêt thérapeutique. Ce plasmide peut porter également une origine de réplication, un gène marqueur, etc.... Ce procédé permet
 5 aussi de purifier de l'ADN, linéaire ou circulaire, portant une séquence d'intérêt, à partir d'un mélange comprenant des ADN de différentes séquences.

Généralement, l'ADN de départ est produit par un microorganisme hôte modifié par les techniques de l'ADN recombinant. A cet égard l'hôte contenant l'ADN double brin que l'on cherche à récupérer est tout d'abord multiplié et amplifié. Pour ce
 10 faire on utilise les techniques classiques de fermentation permettant d'obtenir une forte densité cellulaire. La technique la plus couramment employée est celle dite de "fed-batch" qui est abondamment décrite dans la littérature (Jung et al. *Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol.* 1988, 139, p129-146 ; Bauer et al. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, 18, p81-94).

La fermentation est suivie par une lyse des cellules. Pour lyser les cellules on
 15 peut utiliser soit un système mécanique soit un système chimique suivant le type de cellules concerné ou suivant que l'on souhaite travailler sur lysat brut ou sur lysat clair. Pour la lyse mécanique, on utilise de préférence des systèmes qui ne dénaturent pas l'ADN (agitation, choc thermique, choc osmotique). Ces méthodes ne sont pas utilisables pour casser des cellules procaryotes. En effet les traitements mécaniques
 20 utilisés pour casser des cellules procaryotes sont dénaturant pour l'ADN. La lyse mécanique est préférentiellement réservée aux cellules eucaryotes, pour les cellules procaryotes on préférera une lyse chimique.

Les cellules sont lysées chimiquement par un mélange de soude et de SDS, durant ce traitement le pH passe à 12. Le pH du lysat ainsi obtenu va être ramené à
 25 environ 6 ce qui entraîne la précipitation des protéines d'une partie de l'ADN chromosomique et de l'ARN. On élimine ce précipité par centrifugation.

Un mode de réalisation préféré de l'invention consiste tout d'abord à faire subir aux cellules contenant l'ADN double brin à purifier une lyse chimique qui permet d'obtenir un lysat clair. Le lysat clair ainsi obtenu subit une diafiltration et c'est le

concentrat ainsi obtenu qui est chromatographié sur colonne hydroxyapatite céramique.

Le lysat cellulaire peut être un lysat de cellules procaryotes ou eucaryotes.

5 S'agissant de cellules procaryotes, on peut citer par exemple les bactéries E. coli, B. subtilis, S. typhimurium ou Streptomyces. S'agissant de cellules eucaryotes, on peut citer les cellules animales, les levures, les champignons, etc..., et plus particulièrement, les levures Kluyveromyces ou Saccharomyces ou les cellules COS, CHO, C127, NIH3T3, etc....

10 Le procédé de l'invention est particulièrement avantageux puisqu'il permet d'obtenir, de manière rapide et simple, de l'ADN plasmidique de très haute pureté. En particulier, comme illustré dans les exemples, ce procédé permet de séparer efficacement l'ADN plasmidique considéré de composants contaminants, tels que l'ADN chromosomique fragmenté, l'ARN, les endotoxines, les protéines, les nucléases, etc.... Plus particulièrement, le procédé de l'invention permet d'obtenir des
15 préparation d'ADN double brin, notamment plasmidique, pratiquement exemptes d'ADN chromosomique (< 0,5%). En outre les préparations d'ADN obtenues ont également une teneur en endotoxines très faible (< 50 EU/mg), compatible avec une utilisation pharmaceutique.

20 La demanderesse a montré que, de manière tout à fait étonnante, la combinaison des deux étapes décrites plus haut à savoir chromatographie sur colonne Hydroxyapatite suivie ou précédée par une chromatographie Triple Hélice, permet d'obtenir des préparations d'ADN plasmidique ayant une teneur en ADN chromosomique de 0.01%. De manière tout à fait préférentielle l'invention concerne également des préparation d'ADN plasmidique ayant une teneur en ADN
25 chromosomique inférieure ou égale à 0.01%.

L'invention concerne également des préparations d'ADN plasmidique ayant une teneur en endotoxines inférieure à 50 EU/mg, préférentiellement inférieure à 10 EU/mg. La teneur en endotoxines est donc très en dessous de la teneur autorisée qui est de

350 EU/ injection pour une personne pesant 70 kg (une EU est une Endotoxin Unit et est égale à 100 pg).

La présente invention décrit donc des compositions comprenant de l'ADN plasmidique utilisable pharmaceutiquement notamment en thérapie génique ou cellulaire in vivo ou ex vivo. A cet égard, l'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant de l'ADN double brin, linéaire ou plasmidique, préparé selon le procédé décrit ci-avant.

Les compositions peuvent comporter l'ADN plasmidique "nu" ou associé à des vecteurs de transport tels que les liposomes, les nanoparticules, les lipides cationiques, les polymères, des protéines ou virus recombinants, etc.

La présente demande sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

MATERIEL ET METHODES

1. Construction du plasmide pXL2784.

Dans les expériences qui suivent on a utilisé un plasmide spécifique pXL2784. Ce plasmide comporte une cassette contenant le promoteur du Cytomégalo virus, le gène codant pour la luciférase et une séquence homopurique- homopyrimidique (GAA)₁₇. La construction de ce plasmide est décrite ci-après. Il est bien évident que le procédé selon l'invention n'est pas limité au plasmide décrit.

1.1. Description du plasmide pXL2784

Le plasmide pXL2784 est construit à partir du vecteur plasmidique pXL2675 (2,513 kb), réplicon minimal du plasmide ColE1 issu du plasmide pBluescript (ORI) et ayant pour marqueur de sélection le gène du transposon Tn₅ codant pour la résistance à la kanamycine. Le plasmide pXL2784 contient aussi une séquence homopurique-homopyrimidique (GAA)₁₇ issue du plasmide pXL2563 et pouvant se lier à un oligomère (CTT)_n où n=1 à 17, pour générer localement une structure triple hélice et

permettre une purification par affinité. Le plasmide pXL2784 possède le locus cer (382 bp) issu du plasmide ColE1 et cloné dans le plasmide pXL565 ; le locus cer contient une séquence site spécifique des recombinaisons XerC/XerD et conduit à la résolution de multimères de plasmides. Le transgène cloné sur ce plasmide pXL2784 est une cassette d'expression (3,3 kb) du gène luc codant pour la luciférase de Photinus pyralis sous contrôle du promoteur P CMV cytomégalo virus humain, cette cassette provient du plasmide pXL2622.

Le plasmide a une taille de 6390 bp. La carte du plasmide pXL2784 est présentée sur la figure 1, et sa construction est détaillée ci-après.

10 1.2. Vecteur minimal pXL2675

Après avoir rendu l'extrémité BsaI franche par action du fragment de Klenow, le fragment BsaI-PvuII de 1,15 kb du plasmide pBKS+ (Stratagen) a été cloné avec le fragment SmaI de 1,2 kb du plasmide pUC4KIXX (Pharmacia) pour générer le plasmide pXL2647.

15 L'oligonucléotide 5542 :

5'-AGCTTCTCGA GCTGCAGGAT ATCGAATTCG GATCCTCTAG AGC
GGCCGCG AGCTCC-3' (SEQ ID N°10)

et l'oligonucléotide 5543 :

5'-AGCTGGAGCT CGCGGCCGCT CTAGAGGATC CGAATTCGAT ATC
20 CTGCAGC TCGAGA-3'(SEQ ID N°11)

ont été hybridés entre eux puis clonés au site HindIII du pXL2647 générant le plasmide pXL2675. Ce plasmide comprend le multisite HindIII, XhoI, PstI, EcoRV, EcoRI, BamHI, XbaI, NotI, SstI entre l'origine de réplication et le gène codant pour la résistance à la kanamycine.

1.3. Cassette luciférase dans le plasmide pXL2622

Le promoteur CMV contenu dans le fragment MluI-HindIII de 660 bp du plasmide pcDNA3 (provenant d'Invitrogen) a été cloné entre les sites MluI-HindIII du plasmide pGL2 basic (Promega contient le gène de la luciférase) pour générer le plasmide pXL2622.

1.4. Plasmides pXL2563 et pMTL22-TH contenant une séquence susceptible de former une triple hélice avec un oligonucléotide.

L'oligonucléotide 4817 :

5'-GATCCGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA A
GAAGAAGAA GAAGAAGG-3'(SEQ ID N°12)

et l'oligonucléotide 4818 :

5'-AATTCCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCT
TCTT CTTCTTCG-3'(SEQ ID N°13)

ont été hybridés entre eux et clonés aux sites EcoRI et BamHI du plasmide pBluescriptII KS pour former le plasmide pXL2563. Le fragment EcoRI-BamHI de 62 bp est cloné aux sites EcoRI-BamHI du plasmide pMTL22 (P. Minton 1988 Gene 68:139) pour générer le plasmide pMTL22-TH.

1.5. Plasmides pXL565 et pXL2781 contenant le locus cer

Le fragment HpaII de 382 bp du plasmide ColE1 (P-L Biochemicals) a été cloné au site AccI du plasmide M13 mp7 (Messing et coll. 1981 Nucleic Acids Res 9:309) pour former le plasmide pXL565. Le fragment BamHI de 382 bp du pXL565 a alors été cloné au site BglII du plasmide pSL301 (Invitrogen) pour créer le plasmide pXL2781.

1.6. Construction du plasmide pXL2784

Le fragment BamHI-XhoI du plasmide pXL2781 de 382 bp et contenant le locus cer est cloné aux sites BamHI et XhoI du plasmide pXL2675 pour créer le plasmide pXL2782.

5 Le fragment BglII-BamHI du plasmide pMTL22-TH de 62 bp contenant la séquence (GAA)₁₇ est cloné au site BamHI du plasmide pXL2782 pour former le plasmide pXL2783.

Enfin le fragment SalI-SpeI de 3,3 kb du plasmide pXL2622 et contenant la cassette de la luciférase est cloné aux sites XhoI et NheI du plasmide pXL2783 pour créer le plasmide pXL2784. Il est bien entendu que toute autre cassette d'expression
10 d'un gène peut être insérée à la place de la cassette luciférase

La souche DH1 (Maniatis et al., 1989) contenant ce plasmide est cultivée en fermenteur de 2, 7 et jusqu'à 800 litres. D'autres souches peuvent également être utilisées.

2. Fermentation

15 L'hôte contenant l'ADN plasmidique à cultiver peut être obtenu par des techniques classiques de fermentation (Jung et al. *Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol.* 1988, 139, p129-146 ; Bauer et al. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, 18, p81-94) la technique du fed batch étant préférée. Après fermentation, les cellules sont récupérées, à l'échelle laboratoire, c'est à dire pour des volumes inférieurs à 5l, par centrifugation classique
20 (20 mn à 10000 rpm) ou par centrifugation en continu pour des volumes plus importants (volumes industriels pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de litres). Les cellules ainsi récupérées peuvent être utilisées tout de suite ou congelées à - 80°C.

3. Lyse chimique (lysate clair)

25 Les cellules sont, le cas échéant, décongelées puis lysées. La lyse chimique se décompose en trois étapes. La première consiste à remettre en suspension les cellules dans un tampon Tris 25mM pH 6,8, glucose 50mM, EDTA 10mM ou équivalent. La lyse des cellules est alors effectuée dans un mélange contenant NaOH 0,2M et SDS

1%. Le pH de la solution est d'environ 12. Le choix d'un détergent ionique s'impose, en effet un détergent non ionique donne des rendements d'extraction 10 fois plus faibles. La lyse est suivie d'une pseudo-neutralisation du milieu en présence d'acétate de potassium (le pH final de la solution est compris entre 5.5 et 6). Cette acidification
5 du milieu conduit à l'apparition d'un précipité contenant les protéines, une partie de l'ADN chromosomique et de l'ARN. Cette précipitation est due à la réaction du sodium dodecyl sulfate (SDS) avec l'acétate de potassium qui forment un précipité blanc de potassium dodecyl sulfate

Le précipité doit être éliminé. Pour ce faire on procède par centrifugation en
10 pots (15 min, 8000 rpm) si les volumes sont inférieurs à 5 litres ou par centrifugation en continu si les volumes sont plus élevés (> 5 litres). Une autre méthode pour éliminer le surnageant consiste à effectuer une filtration sur filtre en profondeur de porosité supérieure ou égale à 20 μm (PALL, profile II utilisé selon les spécifications du fabricant).

15 4. Diafiltration

Le surnageant récupéré après la lyse chimique est soumis à une diafiltration afin de concentrer l'ADN plasmidique et d'éliminer les molécules de petites masse moléculaire, en particulier les sels qui sont présents à fortes concentrations. Cette diafiltration se fait sur membrane de point de coupure compris entre 50 et 300 kD
20 suivant la taille des plasmides. De préférence on utilise une membrane de point de coupure 100kD. La valeur de 100kD est une valeur nominale donnée pour des protéines qui sont des molécules globulaires. On considère que pour les molécules d'acides nucléiques, qui ont une structure spatiale différente, toutes les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 30kd sont éliminées. On mesure par HPLC la quantité
25 d'ADN présent dans la solution après diafiltration et la quantité présente dans le lysat clair. Le rapport ainsi déterminé donne le rendement de cette étape qui est supérieur ou égal à 80%.

Au cours de cette diafiltration, les sels sont éliminés. Ils sont remplacés par un tampon phosphate 10mM. Il est ainsi possible d'appliquer le produit directement sur une colonne de chromatographie, en particulier de Ceramic Hydroxyapatite™

5 L'ADN plasmidique issu de la chromatographie d'affinité triple hélice est de nouveau diafiltré afin de concentrer l'échantillon et d'éliminer les sels indésirables. Ceci permet d'équilibrer le produit dans le tampon de formulation approprié. Pour cela, une diafiltration sur membrane de point de coupure compris entre 10 et 50kD est effectué. Le rendement est supérieur à 80%.

Le produit est ensuite filtré stérilement et soumis à analyses avant formulation.

10 5. Chromatographie sur colonne de Ceramic hydroxyapatite™

Le gel de Ceramic Hydroxyapatite™ est coulé dans une colonne de taille appropriée suivant le volume de l'échantillon à purifier et selon la pureté de l'échantillon de départ. Pour déterminer la taille de la colonne et le volume du gel on mesure par HPLC la quantité en mg/ml d'ADN présent dans la solution de départ. On
15 estime en effet que au moins 0.1mg d'ADN sont fixés par ml d'Hydroxyapatite cette valeur pouvant varier jusqu'à 1 mg voir plus en fonction de la quantité d'ARN présent dans la solution de départ. L'ARN se fixe sur le gel et plus la quantité d'ARN est importante moins l'ADN pourra se fixer. L'ARN est éliminé par élution différentielle. La colonne est équilibrée en tampon phosphate de faible force ionique (10 mM).
20 L'échantillon est déposé sur le gel à un débit linéaire de 50 cm/h. Le gel est ensuite soumis à un lavage par un tampon phosphate de conductivité plus élevée (150 mM). La majeure partie de l'ARN contenu dans l'échantillon est éliminée à ce stade. L'ADN plasmidique est élué en augmentant à nouveau la conductivité du tampon phosphate (250mM). Les derniers contaminants sont éliminés par application de NaOH 0.5N qui
25 est neutralisée par du tampon phosphate à forte molarité (500mM) avant réutilisation éventuelle de la colonne. Dans le cas d'une production pharmaceutique, ce support a l'avantage de pouvoir subir une décontamination chimique en place puisqu'il résiste à la soude 0.5M, agent de nettoyage classique en chromatographie, mais aussi à des fortes concentrations d'éthanol.

La résolution de l'hydroxyapatite céramique est excellente. Cette étape du procédé permet d'éliminer plus de 80% des ARN, 99.9% d'ADN chromosomique et de diminuer d'un facteur 1000 la teneur en endotoxines. De plus cette technologie évite l'emploi de toutes enzymes d'origine bovine ou autre (pas de Rnase, ni de protéinase K), en outre sa résistance aux agents chimiques nous a permis de l'utiliser à ce jour plus de 40 fois sans problème de reproductibilité. Le rendement de chromatographie est supérieur ou égal à 80%.

6. Chromatographie d'affinité avec formation d'une triple hélice.

6.1. Préparation de la colonne

10 Matériel : La colonne utilisée est une colonne HiTrap activée au NHS (N-hydroxysuccinimide, Pharmacia) de 5 ml, connectée sur une pompe péristaltique (débit < 1ml/min). L'oligonucléotide spécifique utilisé possède un groupement NH₂ en 5'.

Les tampons utilisés dans cet exemple sont les suivants :

- 15
- Tampon de couplage : NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.
 - Tampon A : éthanolamine 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.
 - Tampon B : acétate 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4.

20 Méthode : La colonne est lavée par 30 ml de HCl 1 mM, puis l'oligonucléotide dilué dans le tampon de couplage (250 nmoles dans 5 ml) est appliqué sur la colonne et laissé 30 minutes à température ambiante. La colonne est lavée 3 fois successives par 30 ml de tampon A puis 30 ml de tampon B. L'oligonucléotide est ainsi lié covalamment à la colonne par une liaison CONH. La colonne est stockée à 4°C et peut être utilisée au moins quatre fois.

6.2. Purification de plasmide

25 Matériel :

Le plasmide pXL2784 (décrit en 1) a été purifié sur la colonne HiTrap couplée à l'oligonucléotide décrite en 7.1. Les tampons utilisés lors de cette purification sont les suivants :

Tampon F : NaCl 2M, acétate 0,2 M, pH 4,5.

5 Tampon E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

Méthode :

La colonne est lavée avec du tampon F, puis la solution contenant le plasmide est appliquée sur la colonne et incubée à moins deux heures à température ambiante. La colonne est lavée avec du tampon F puis l'élution se fait par du tampon E.

10 7. Chromatographie échangeuse d'ions.

L'échantillon pré-purifié est ensuite soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions faibles. En effet les anions forts ont la propriété de fixer très fortement l'ADN, si fortement qu'il est très difficile de récupérer le produit (le rendement est alors inférieur à 60%). C'est pourquoi la demanderesse utilise des
15 échangeurs d'anions faibles qui ne retiennent pas l'ADN plasmidique mais qui fixent les ARN résiduels. On utilisera donc de préférence un échangeur d'anions faibles de type DEAE Sepharose ou DEAE hyper D ou équivalents. Le gel est équilibré en tampon phosphate 10mM, l'échantillon provenant de l'étape de chromatographie sur Ceramic Hydroxyapatite est directement appliqués sur le gel. L'ARN fixé est ensuite éliminé en
20 appliquant une solution concentrée de NaCl. La décontamination chimique peut être faite avec une solution de soude 0.5 M ce qui permet de travailler dans de bonnes conditions d'hygiène (élimination des endotoxines et des risques de contamination microbienne.)

25 8. Dosage de l'ADN plasmidique dans des échantillons complexes par HPLC

L'objectif de cette méthode est de pouvoir quantifier l'ADN plasmidique au cours des différentes étapes de purification afin de déterminer des rendements. On peut ainsi juger quantitativement et qualitativement de l'efficacité des différentes opérations

La technique utilisée est la suivante:

- 5 Le support chromatographique est un gel Poros R2 de chez Perseptive Biosystems. Il s'agit d'un support de polystyrène-divinylbenzène, la taille des particules est de 10 μm . La taille des pores de perfusion est de 6000 à 8000 Angströms, la taille des pores de diffusion étant de 500 à 1000. Le volume du gel est de 1,7ml.

- 10 Il s'agit d'une chromatographie paire d'ions. Le système de solvants est eau, triéthylamine acétate pH 7,1 / triéthylamine acétate acétonitrile 90%.

Le débit est de 3 ml/min. Nous avons défini le gradient de façon à distinguer l'ADN plasmidique des ARN.

- 15 L'échantillon de référence est un ADN plasmidique purifié sur Qiagen selon les instructions du fabricant. Sur un gel d'agarose, cet échantillon ne contient que de l'ocDNA et du cccDNA. En HPLC, il ne donne qu'un seul pic. Sa concentration a été déterminée en mesurant sa DO à 260 nm et en prenant pour base 1 unité DO = 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN.

Nous avons donc injecté des quantités croissantes de ce produit afin d'effectuer une gamme d'étalonnage.

- 20 La surface des pics correspondant au temps de rétention de l'ADN de référence sont comparés à la gamme. Une quantification peut donc être effectuée.

9. Dosage de l'ADN chromosomique résiduel

- 25 L'ADN génomique résiduel est quantifié par PCR en utilisant des amorces dans le gène galK d'E. coli. La séquence des amorces du gène galK d'E. coli est (Debouck et al., Nucleic Acids Res., 1985, 13, 1841-1853) :

5'-CCG AAT TCT GGG GAC CAA AGC AGT TTC-3' (SEQ ID N°14)

et 5'-CCA AGC TTC ACT GTT CAC GAC GGG TGT-3' (SEQ ID N°15).

Le milieu réactionnel comprend, dans du tampon PCR (Promega France, Charbonnières) : 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM dXTP (Pharmacia, Orsay) ; 0,5 µM en amorce ; 20 U/ml Taq polymérase (Promega). La réaction est effectuée suivant la

5 séquence : - 5 min. à 95°C

- 30 cycles de 10 sec. à 95°C

30 sec. à 60°C

1 min. à 78°C

- 10 min. à 78°C.

10 Le fragment d'ADN amplifié, d'une longueur de 124 paires de bases, est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% en présence de SybrGreen I (Molecular Probes, Eugene, USA), puis quantifié par référence à une gamme d'ADN génomique Ultrapur d'*E. coli*, souche B (Sigma, réf. D4889).

- 10. Transfection in vitro de cellules de mammifères

15 Cette méthode est employée pour doser l'activité biologique du plasmide purifié par le procédé selon l'invention. Les cellules utilisées sont des NIH 3T3, ensemencées la veille de l'expérience dans des plaques de culture à 24 puits, à raison de 50.000 cellules/puits. Le plasmide est dilué dans du NaCl 150 mM et mélangé avec

20 un lipofectant. On utilise un rapport charges positives du lipofectant/charges négatives de l'ADN égal à 3. Le mélange est vortexé, laissé 10 minutes à température ambiante, dilué dans du milieu de culture dépourvu de sérum de veau foetal, puis ajouté aux cellules, à raison de 1 µg d'ADN par puits de culture. Après deux heures à 37°C, on ajoute 10% v/v de sérum de veau foetal et les cellules sont incubées 48 heures à 37°C

25 en présence de 5% de CO₂. Les cellules sont lavées deux fois au PBS et l'activité luciférase est mesurée selon le protocole décrit (kit Promega, Promega Corp. Madison, WI), sur un luminomètre Lumat LB9501 (EG et G Berthold, Evry). Les protéines sont dosées avec la technique BCA (Pierce, Interchim, Asnières).

11. Techniques diverses :

Le plasmide obtenu, analysé par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium, se présente sous la forme d'une seule bande d'ADN circulaire "super enroulé". Aucune trace d'ADN de haut poids moléculaire (chromosomique), ni d'ARN n'est détectable dans le plasmide purifié.

La concentration en protéines dans les échantillons est mesuré par Micro-BCA (Pierce) selon les instructions du fabricant.

La concentration en endotoxines est estimée par le dosage LAL (Biosepra) selon les instructions du fabricant.

Les méthodes classiques de biologie moléculaire telles que les digestions par des enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, la transformation dans *E. coli*, la précipitation des acides nucléiques etc, sont décrites dans la littérature (Maniatis et al., T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York ; Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kinston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Willey and Sons, New York.). Les séquences nucléotidiques ont été déterminées par la méthode de terminaison de chaînes en suivant le protocole déjà présenté (Ausubel et al., 1987).

Les enzymes de restriction ont été fournies par New-England Biolabs, Beverly, MA (Biolabs).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont incubés dans un tampon Tris-HCl pH 7.4 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 2 mM, en présence d'ADN ligase du phage T4 (Biolabs,).

Les oligonucléotides sont synthétisés en utilisant la chimie des phosphoramidites protégés en β par un groupement cyanoéthyl (Sinha, N. D., J. Biernat, J. McManus and H. Köster. 1984. Polymer support oligonucleotide synthesis,

XVIII: Use of β -cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. Nucl. Acids Res., 12, 4539-4557 ; Giles, J. W. 1985. Advances in automated DNA synthesis. Am. Biotechnol., Nov./Dec.) avec le
 5 synthétiseur automatique d'ADN Biosearch 8600 en utilisant les recommandations du fabricant.

Les ADN ligaturés ou à tester pour leur efficacité de transformation sont utilisés pour transformer la souche rendue compétente: E. coli DH5 α [F' / endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, D(lacZYA-argF)U169, deoR,
 10 F80dlac(lacZDM15)]

Les minipréparations d'ADN plasmidique sont faites suivant le protocole de Klein et al., 1980.

Le milieu de culture LB est utilisé pour la croissance des souches d'E. coli (Maniatis et al., 1982). Les souches sont incubées à 37°C. Les bactéries sont étalées
 15 sur des boîtes de milieu LB supplémenté avec des antibiotiques appropriés.

EXEMPLES

Exemple 1. Purification d'un ADN plasmidique sur colonne hydroxyapatite céramique

1.1. Préparation du lysat clair

20 Matériel :

Les solutions utilisées dans cet exemple sont les suivantes :

Tris 25mM pH 6,8, glucose 50mM, ETDA 10mM : solution 1

NaOH 0,2M et SDS 1% : solution 2

Acétate de potassium 3M, pH 5: solution 3

25 Méthode:

200 g de cellules sont mises en suspension dans 2200 ml de solution 1. La solution 2 (2200 ml également) est ensuite additionnée. Enfin, 1100 ml de solution 3

sont rajoutés. Le précipité alors formé est éliminé par centrifugation à 9000 rpm pendant 30 min. On obtient 5200 ml de surnageant.

1.2. Diafiltration

Matériel :

5 Membrane Maximate (Filtron) de point de coupure 100 kD de surface 1860 cm²

Tampon : Phosphate de sodium 100 mM pH 6,8

Méthode :

10 Avant utilisation, la membrane subit une décontamination chimique à la soude 0,5M pendant 1H. La soude est ensuite éliminée par de l'eau ppi.

Le surnageant obtenu lors de l'étape 1.1 est concentré environ 10 fois puis diafiltré contre 4 volumes d'eau puis contre 4 volumes de tampon phosphate 100mM et pH 6,8. Le volume final est de 810 ml. L'échantillon contient alors 224 mg d'ADN plasmidique déterminé par HPLC.

15 1.3. Purification sur Ceramic Hydroxyapatite™

Matériel :

Les tampons utilisés lors de cette purification sont les suivants :

Tampon A = tampon 10 mM phosphate pH 6.8

Tampon B = tampon 150 mM phosphate pH 6.8 ,

20 Tampon C = tampon 250 mM phosphate pH 6;8

Tampon D = tampon 500 mM phosphate pH 6,8

NaOH 0,5M

Méthode :

La colonne (de diamètre 113 mm et de hauteur 17 cm) contient 1700 ml de gel.

25 Avant utilisation, le gel subit une décontamination chimique par de la soude 0,5M pendant 1 heure. La soude est ensuite éliminée par application de tampon D. Puis, la colonne est équilibrée en tampon A.

On applique sur le gel 610 ml provenant des 810 ml (soit 171 mg) obtenus précédemment. Le débit est de 60 ml/min. Le gel est ensuite lavé par 6 L de tampon B. Le produit est ensuite élué en appliquant du tampon C. Le volume d'éluat est de 1520 ml et contient 147 mg d'ADN plasmidique (déterminé par HPLC).

- 5 Le gel est ensuite régénéré par lavage avec de la soude (NaOH 0,5M) suivi par du tampon D. Le gel est alors prêt pour un nouveau cycle.

L'ensemble des opérations est suivi par spectrométrie UV à 254 nm.

1.4. Purification sur DEAE Sepharose

Matériel :

- 10 Les tampons utilisés lors de cette purification sont les suivants :
Tampon A , NaCl 1M et NaOH 0,5M.

Méthode :

La colonne (de diamètre 50 mm et de hauteur 6 cm) contient 110 ml de gel.

- 15 Avant utilisation, le gel subit une décontamination chimique par de la soude 0,5M pendant 1 heure. La soude est ensuite éliminée par une solution de NaCl 1M .
Puis, la colonne est équilibrée en tampon A.

- 20 1130 ml issues des 1520 ml (soit 110 mg) obtenus précédemment sont appliqués sur le gel à un débit de 50 ml/min. L'ADN n'étant pas retenu, l'effluent est recueilli (1036 ml) et contient 104 mg d'ADN. Les produits retenus sur le gel sont ensuite éliminés par une solution de NaCl 1M. Le gel est alors lavé par de la soude 0,5M suivi de NaCl 1M. Le gel est alors prêt pour une nouvelle opération.

L'ensemble des opérations est suivi spectrométrie UV à 254 nm.

1-5 Diafiltration

Matériel :

- 25 Membrane Ultrasette (Filtron) de point de coupure 30 kD de surface 860 cm²
Tampon : eau ppi

Méthode :

Avant utilisation, la membrane subit une décontamination chimique à la soude 0,5M pendant 1H. La soude est ensuite éliminée par de l'eau ppi. 720 ml du produit obtenu lors de l'étape précédente sont concentrés environ 3 fois puis diafiltrer deux fois contre 4 volumes d'eau ppi. Le volume final est de 210 ml. L'échantillon contient alors 62 mg d'ADN plasmidique déterminé par HPLC.

1.6 Caractéristiques de l'ADN.

Le procédé décrit ci-dessus permet d'obtenir le plasmide quasiment pur. Les différentes composants de l'échantillon final ont été déterminés et sont récapitulés ci-après.

- ARN : non détectable en gel d'agarose ou en HPLC
- ADN chromosomique déterminé par PCR: <0.5 %
- ADN super-enroulé déterminé par HPLC >80 %
- endotoxines (LAL) < 50 EU/mg
- protéines (microBCA) < 1µg/ml
- activité biologique in vitro :

pXL2784 lot 42DNA95 : $20 \cdot 10^6$ RLU/ µg protéines (à comparer avec le même plasmide purifié sur gradient de Chlorure de Cesium = $13 \cdot 10^6$ RLU/ µg protéines).

1.7 Variante.

Le procédé décrit ci-dessus a été reproduit en effectuant dans l'étape 1.1, une filtration sur membrane de profondeur à la place de la centrifugation. Cette variante du procédé permet d'obtenir un plasmide de pureté pharmaceutique, dont les caractéristiques sont récapitulés ci-après.

- ARN : non détectable en gel d'agarose ou par HPLC
- ADN chromosomique déterminé par PCR : < 0.5 %
- ADN superenroulé déterminé par HPLC >70 %
- endotoxines (LAL) < 50 EU/mg
- 5 - protéines (micro BCA) < 1 µg/ml

Exemple 2 Purification de l'éluat d'hydroxyapatite par chromatographie d'affinité triple hélice

2.1. Préparation de la colonne d'affinité

La colonne utilisée est une colonne HiTrap activée au NHS (N-hydroxysuccinimide, Pharmacia) de 5 ml, connectée sur une pompe péristaltique. L'oligonucléotide spécifique utilisé possède un groupement NH₂ en 5'. Sa séquence est la suivante :

5'-GAGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT-3' (SEQ ID N°1).

Les tampons utilisés dans cet exemple sont les suivants :

15 Tampon de couplage : NaHCO₃ 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.

Tampon A : éthanolamine 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3.

Tampon B : acétate 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4.

La colonne est lavée par 30 ml de HCl 1 mM, puis l'oligonucléotide dilué dans le tampon de couplage (250 nmoles dans 5 ml) est appliqué sur la colonne et laissé 30 minutes à température ambiante. La colonne est lavée 3 fois successives par 30 ml de tampon A puis 30 ml de tampon B. L'oligonucléotide est ainsi lié covalamment à la colonne par une liaison CONH. La colonne est stockée à 4°C.

2.2. Purification du plasmide

Les tampons utilisés sont les suivants :

Tampon F : NaCl 2M, acétate 0,2 M, pH 4,5.

Tampon E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

5 La colonne est équilibrée dans le tampon F, puis 9ml d'éluat d'hydroxyapatite obtenu dans les conditions décrites dans l'exemple 1, préalablement ajustés à 2M NaCl et pH 4,5, sont appliqués en boucle sur la colonne pendant une nuit à température ambiante (débit 0,5 ml/min). La colonne est lavée avec du tampon F puis l'élution se fait par du tampon E. L'ADN est détecté par spectrométrie U.V. à 254 nm.

2.3. Caractéristiques de l'ADN purifié

10 L'ADN purifié analysé par HPLC (méthode décrite ci-dessus) se présente sous forme d'un seul pic à un temps de rétention de 24,8 min. Aucune trace d'ARN n'est détectable. De même, après électrophorèse sur gel d'agarose 1% et coloration au bromure d'éthidium, l'ADN purifié ne présente aucune trace détectable d'ARN.

15 L'ADN a également été analysé par chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Gen-Pak Fax Waters, qui sépare l'ADN relâché de l'ADN surenroulé. L'échantillon purifié contient 97% d'ADN surenroulé contre 80% d'ADN surenroulé dans l'échantillon déposé.

20 L'ADN génomique d'*E. coli* a été quantifié par PCR selon la technique décrite au paragraphe 3 : l'ADN purifié sur colonne d'affinité contient environ 0,01% d'ADN génomique.

Exemple n°3

3.1. Purification du plasmide.

On utilise une colonne d'affinité préparée comme décrit à l'exemple 2 avec l'oligonucléotide de séquence :

25 5'-CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT-3' (SEQ ID N°2).

Les tampons utilisés sont :

Tampon F : NaCl 2M, acétate de sodium 0,2 M, pH 4,5.

Tampon E : Tris 1 M, HCl pH 9, EDTA 0,5 mM.

- 5 La colonne est équilibrée dans le tampon F, puis on dépose 0.8mg de plasmide purifié selon le protocole de l'exemple 1.7, dilué dans 10 ml de tampon F. L'échantillon est recirculé en boucle sur la colonne pendant une nuit à température ambiante (débit 0,5 ml/min). La colonne est lavée avec du tampon F puis l'élution se fait par du tampon E. L'ADN est détecté par spectrométrie U.V. à 254 nm.

10 3.2. Caractéristiques de l'ADN purifié

L'ADN obtenu a été analysé par chromatographie échangeuse d'anions sur colonne Gen-Pak Fax Waters, qui sépare l'ADN relâché de l'ADN surenroulé. L'échantillon purifié contient 100% d'ADN surenroulé, contre 72% dans l'échantillon déposé sur la colonne d'affinité.

- 15 L'ADN génomique d'E. coli a été quantifié par PCR selon la technique décrite plus haut : l'ADN purifié sur colonne d'affinité contient environ 0,01% d'ADN génomique, contre environ 0.3% dans l'échantillon déposé sur la colonne d'affinité.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.

(B) RUE: 20, AVENUE RAYMOND ARON

10

(C) VILLE: ANTONY

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 92165

(G) TELEPHONE: (1) 40.91.70.36

(H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.91

15

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE
DE QUALITE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 15

20

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

25

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GAGGCTTCTT
25

CTTCTTCTTC

TTCTT

45

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

50

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

60

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CTTCTTCTTC
21

TTCTTCTTCT

T

5 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
10 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

20 AAGGGAGGGA
19

GGAGAGGAA

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
30 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

40 AAGGAGAGGA
19

GGGAGGGAA

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
50 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

60 TTGGTGTGGT
19

GGGTGGGTT

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 19 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
10 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

20 CTTCCCGAAG
19

GGAGAAAGG

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
30 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7

40 GAAGGGTTCT
21

TCCCTCTTTC

C

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 13 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
50 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8

60 GAAAAAGGAA
13

GAG

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 17 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
10 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9

AAAAAAGGGA
17

ATAAGGG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 56 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
30 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10

AGCTTCTCGA GCTGCAGGAT ATCGAATTCG GATCCTCTAG AGCGGCCGCG AGCTCC
40 56

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 56 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
50 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11

AGCTGGAGCT CGCGGCCGCT CTAGAGGATC CGAATTCGAT ATCCTGCAGC TCGAGA
60 56

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 58 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

10

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12

20 GATCCGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAGAA GAAGAAGG
 58

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- 25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 58 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

30

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13

40 AATTCCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTCTT CTTCTTCTG
 58

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

50

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

55

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14

60 CCGAATTCTG GGGACCAAAG CAGTTTC
 27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

5

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

10

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15

20

CCAAGCTTCA
27

CTGTTACGA

CGGGTGT

REVENDEICATIONS

1. Procédé de purification d'ADN double brin de pureté pharmaceutique caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite céramique.
- 5 2. Procédé de purification d'ADN double brin caractérisé en ce qu'il comprend deux étapes de chromatographie dont une sur colonne d'hydroxyapatite.
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'affinité ou d'échange d'ions.
- 10 4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'affinité par hybridation spécifique entre une séquence de l'ADN et un oligonucléotide immobilise, avec formation d'une triple hélice.
- 15 5. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'échange d'anions.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 a 5 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de diafiltration.
7. Procédé de purification d'ADN double brin caractérisé en ce qu'il comprend
20 les étapes suivantes :
 - lyse chimique des cellules,
 - diafiltration,
 - chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite céramique,
 - chromatographie d'affinité par hybridation spécifique entre une
25 séquence de l'ADN et un oligonucléotide immobilise, avec formation d'une triple hélice.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'ADN double brin comprend en outre une ou plusieurs séquences d'intérêt.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'ADN double brin est un ADN plasmidique.

5 10. Préparation d'ADN plasmidique recombinant caractérisée par une teneur en ADN chromosomique inférieure ou égale à 0,01 %.

11. Préparation d'ADN plasmidique recombinant purifié selon la revendication 10 caractérisée par une teneur en endotoxine inférieure ou égale à 50 EU/ mg.

10 12. Préparation d'ADN plasmidique recombinant purifié selon la revendication 11 caractérisée par une teneur en endotoxine inférieure ou égale a 10 EU/ mg;

13. Composition pharmaceutique comprenant un ADN obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un médicament à base d'ADN double brin caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de purification dudit ADN double-brin par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite céramique.

5 2. Procédé de purification d'ADN double brin caractérisé en ce qu'il comprend deux étapes de chromatographie dont une sur colonne d'hydroxyapatite céramique.

3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'affinité ou d'échange d'ions.

10 4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'affinité par hybridation spécifique entre une séquence de l'ADN et un oligonucléotide immobilisé, avec formation d'une triple hélice.

15 5. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et une étape de chromatographie d'échange d'anions.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de diafiltration.

20 7. Procédé de purification d'ADN double brin caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- lyse chimique des cellules,
 - diafiltration,
 - chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite céramique,
 - chromatographie d'affinité par hybridation spécifique entre une
- 25 séquence de l'ADN et un oligonucléotide immobilisé, avec formation d'une triple hélice.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'ADN double brin comprend en outre une ou plusieurs séquences d'intérêt.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'ADN double brin est un ADN plasmidique.

5 10. Préparation d'ADN plasmidique recombinant susceptible d'être obtenue par mise en oeuvre du procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisée par une teneur en ADN chromosomique inférieure ou égale à 0,01 %.

11. Préparation d'ADN plasmidique recombinant purifié selon la revendication 10 caractérisée par une teneur en endotoxine inférieure ou égale à 50 EU/ mg.

10 12. Préparation d'ADN plasmidique recombinant purifié selon la revendication 11 caractérisée par une teneur en endotoxine inférieure ou égale a 10 EU/ mg;

13. Composition pharmaceutique comprenant un ADN obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

